

Info Box:

Die PCR (Polymerase Chain Reaction, dt. Polymerase Kettenreaktion) ist ein Verfahren, mit dem ein spezifischer DNA-Abschnitt im Reaktionsgefäß (in-vitro) innerhalb kurzer Zeit millionenfach vermehrt (amplifiziert) werden kann. Entwickelt wurde diese Technik 1984 von dem amerikanischen Biochemiker Kary B. Mullis, der dafür 1993 den Nobelpreis für Chemie erhielt.

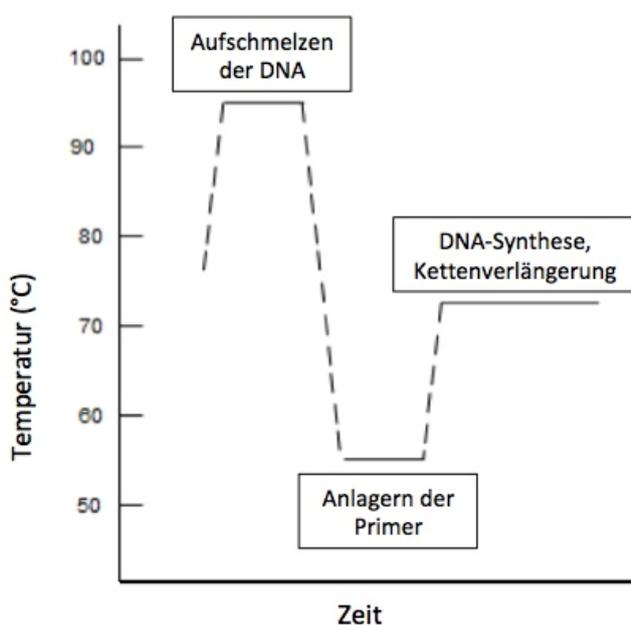
Anwendungsbereiche der PCR:

Die PCR hat die molekulargenetische Forschung revolutioniert und gehört zu den wichtigsten Methoden in der Molekularbiologie, sowie in der medizinischen Forschung und Diagnostik. Anwendung findet sie u. a. bei der Diagnose von Erbkrankheiten, dem genetischen Fingerabdruck und der Erstellung von molekularen Stammbäumen.

Während der Corona Pandemie ist eine besondere Variante der PCR, die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR), in aller Munde, da mit ihr der direkte Virusnachweis erfolgen kann. Siehe dazu auch LoLa-Arbeitsmaterial „SARS-CoV-2“ (Teil 2) - Nachweis einer Infektion“.

Grundprinzip der PCR:

Das Prinzip der PCR basiert auf der zyklisch wiederholten Verdoppelung von DNA mit Hilfe einer thermostabile DNA-Polymerase (z.B. Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*). Für die Reaktion werden Primer als Startmoleküle (s.u.), eine Mischung der vier Desoxynukleotide und der entsprechende Arbeitspuffer benötigt.



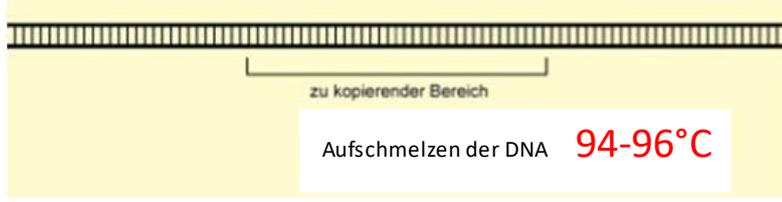
PCR-Maschinen sind programmierbare Temperaturblöcke, in denen das Temperaturprofil abläuft; in der Regel 25 bis 30 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Temperaturschritten: (i) Aufschmelzen des DNA-Doppelstrangs bei etwa 95°C, (ii) Primer-Bindetemperatur (s.u.), (iii) Kettenverlängerung bei 72°C, der optimalen Arbeitstemperatur der thermostabilen Polymerase. Die Dauer des dritten Temperaturschritts hängt von der zu synthetisierenden Molekülgröße ab. Die Polymerase kann unter optimalen Bedingungen *in vitro* 1.000 Nukleotide pro Minute synthetisieren.

PCR: Ablauf der Temperaturschritte

1. Zyklus (1. Schritt)

Polymerase-Kettenreaktion: Ablauf der Zyklen

Beginn der PCR: Denaturierung



Aufschmelzen der DNA **94-96°C**

Jeder PCR-Zyklus besteht aus drei Temperaturschritten. Im ersten Schritt wird die DNA-Vorlage durch hohe Temperatur aufgeschmolzen. So entstehen zwei Einzelstränge, die im nächsten PCR-Schritt als Vorlage (template) dienen.

1. Zyklus (2. Schritt)

Polymerase-Kettenreaktion: Ablauf der Zyklen

Verlängerung der Primer (engl. *extension*) / DNA-Synthese



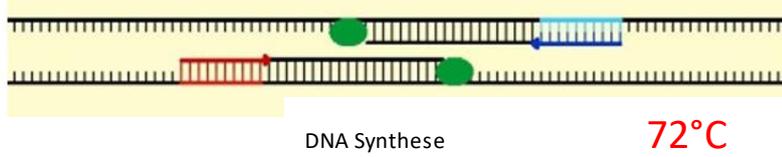
Anlagern der Primer **50-65°C**

Für die DNA-Synthese benötigt die DNA-Polymerase ein 3'-OH-Ende. Dieses wird bereitgestellt von Start-Molekülen (engl. primer). Primer sind kurze, etwa 25 Nukleotide lange, synthetisch hergestellte DNA-Einzelstränge. Ihre Sequenz wird so festgelegt, dass sie den zu amplifizierenden DNA-Bereich flankieren. Die optimale Primerbindetemperatur ist abhängig von der Länge und Basenzusammensetzung der Primer und liegt meist zwischen 50° und 65°C.

1. Zyklus (3. Schritt)

Polymerase-Kettenreaktion: Ablauf der Zyklen

Verlängerung der Primer (engl. *extension*) / DNA-Synthese



DNA Synthese **72°C**

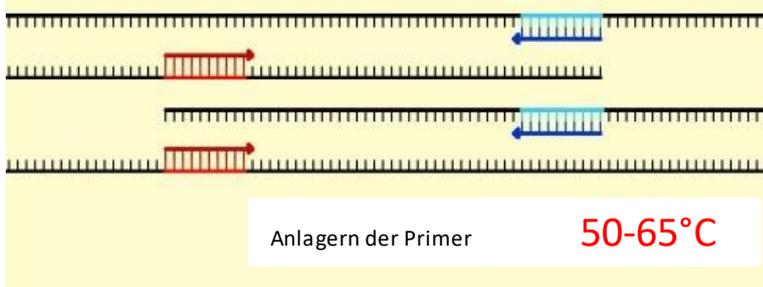
Die 3'-OH Enden der Primer werden von der DNA-Polymerase als Synthesestartpunkte genutzt. Die DNA-Polymerase synthetisiert solange den komplementären DNA-Strang, wie die Versuchsbedingungen dies zulassen; d.h. so lange ein Vorlagenstrang und freie Nukleotide vorhanden sind. 72° ist die optimale Arbeitstemperatur für die hitzestabile DNA-Polymerase.

Polymerase-Kettenreaktion: 2. Zyklus



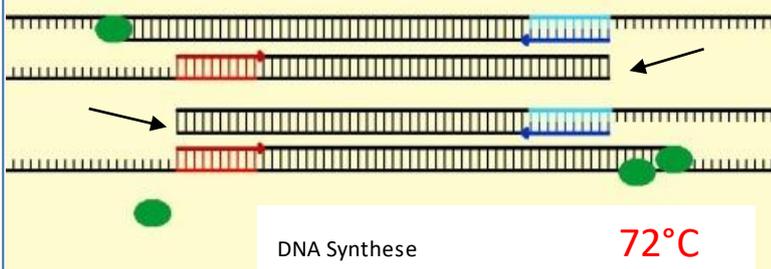
Der zweite Zyklus startet mit den neu synthetisierten DNA-Kopien, die zunächst wieder aufgeschmolzen werden müssen.

Polymerase-Kettenreaktion: 2. Zyklus



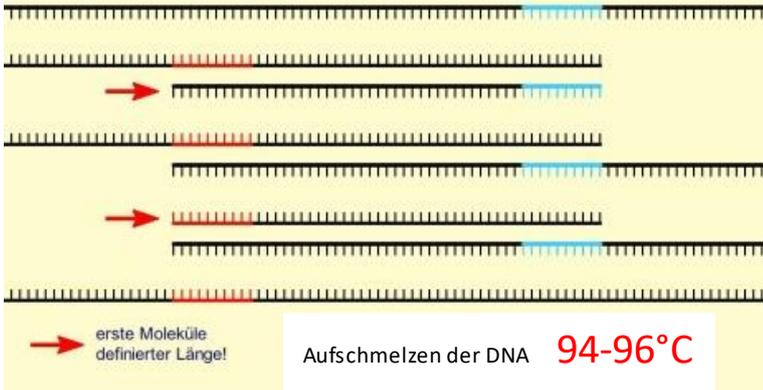
Die Primer finden ihre komplementären Bindestellen im zweiten Zyklus nun jeweils an zwei Vorlagensträngen.

Polymerase-Kettenreaktion: 2. Zyklus



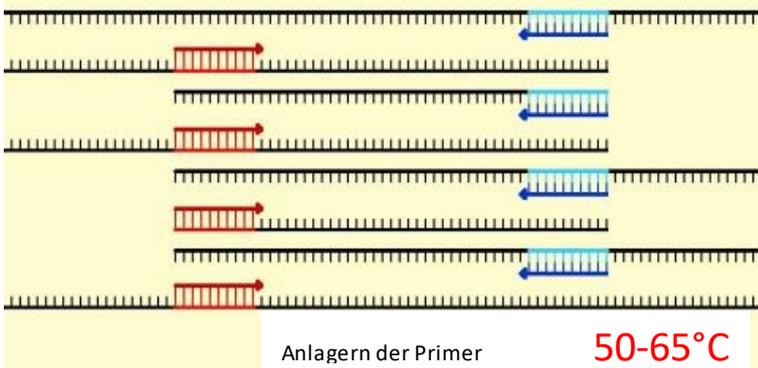
Die DNA-Polymerase startet wiederum die Synthese am 3'OH-Enden der Primer und synthetisiert solange die o.g. Bedingungen erfüllt sind. ACHTUNG: Die beiden markierten Vorlagen-Stränge sind verkürzt; ihr 5'-Ende entspricht dem 5'-Ende der Primer aus dem 1. Zyklus.

Polymerase-Kettenreaktion: 3. Zyklus



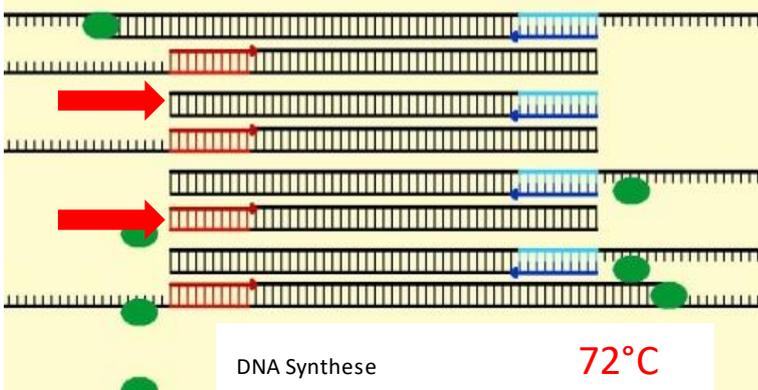
Auf diese Weise liegen im 3. Zyklus erstmals DNA-Moleküle definierter Länge als Vorlage vor (rote Pfeile), die exakt von den Primer-Sequenzen flankiert werden.

Polymerase-Kettenreaktion: 3. Zyklus



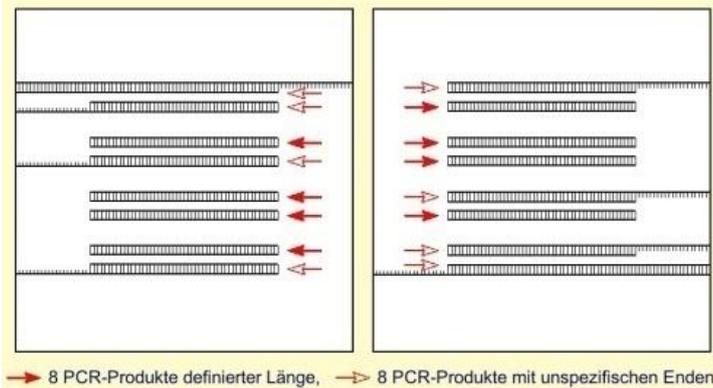
Die Primer binden an die komplementären Sequenzen.

Polymerase-Kettenreaktion: 3. Zyklus



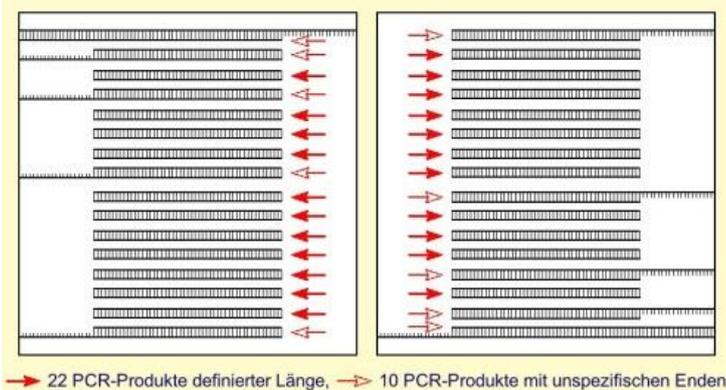
Im 3. Zyklus entstehen erstmals **SPEZIFISCHE DNA-DOPPELSTRÄNGE** (roter Pfeil), die auf beiden Seiten von den Primersequenzen flankiert werden. Dies sind die gewünschten spezifischen PCR-Produkte.

Polymerase-Kettenreaktion: 4. Zyklus



Nach dem 4. Zyklus ist die Anzahl spezifischer Fragmente (mit definierter Länge) und unspezifischer Fragmente bereits gleich groß.

PCR: Ergebnis des 5. Zyklus

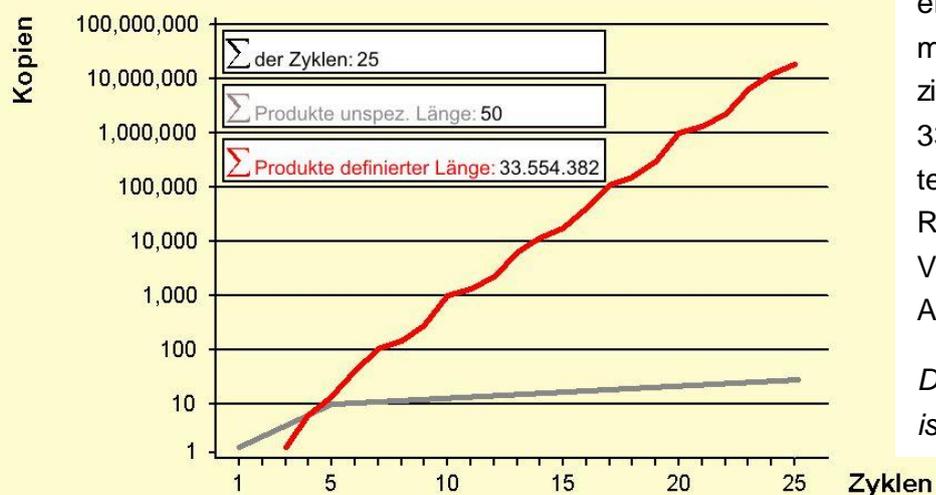


Nach dem 5. Zyklus wird bereits deutlich, wie dynamisch die Vervielfältigung der definierten Fragmente verläuft.

Die unspezifischen Fragmente vermehren sich hingegen nur linear. Nach den üblichen 20-25 PCR-Zyklen ist ihre Anzahl so gering, dass sie später in der Gelelektrophorese nicht sichtbar sein werden.

PCR-Verlauf: graphische Darstellung

(Beginnend mit einem DNA-Molekül als *template*)



Nach 25 Zyklen erhält man aus einem einzelnen Vorlagemolekül theoretisch 50 unspezifische Fragmente und 33.554.382 Fragmente definierter Länge. Da die PCR in der Regel mit mehr als einem Vorlagemolekül startet, ist die Ausbeute entsprechend größer.

Der un stetige rote Kurvenverlauf ist ein Programmier-Artefakt.

Quelle: Die Abbildungen sind einer Animation entnommen, die von B. sc. Inf. Evi Steinhaus im Auftrag des LoLa programmiert wurde.

Fragen zur PCR:

1. Warum passt der Begriff „Aufschmelzen“ der DNA besser als der häufig verwendete Begriff „Denaturieren“?
2. Was sind Primer?
3. Warum entstehen erst im dritten PCR-Zyklus DNA-Fragmente, die der Ziel-DNA exakt entsprechen und später in der Gelelektrophorese auswertbare Ergebnisse liefern?
4. In der graphischen Darstellung sind die Fragmente definierter Länge nicht in einem für eine Exponentialfunktion typischen Kurvenverlauf dargestellt, obwohl sie sich ja nahezu exponentiell vermehrt haben. Woran liegt das?
5. Nennen Sie Unterschiede zwischen der DNA-Synthese *in-vivo* (Replikation) und der DNA-Synthese *in-vitro* (PCR).